



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年 2月 2日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-026594

出 願 人

Applicant(s):

住友化学工業株式会社

2001年10月19日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造

出証番号 出証特2001-3091235

【書類名】 特許願
 【整理番号】 P152484
 【提出日】 平成13年 2月 2日
 【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 C07C 31/02
 C12P 7/02

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会
 社内

【氏名】 朝子 弘之

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会
 社内

【氏名】 松村 賢司

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会
 社内

【氏名】 清水 将年

【特許出願人】

【識別番号】 000002093

【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100093285

【弁理士】

【氏名又は名称】 久保山 隆

【電話番号】 06-6220-3405

【選任した代理人】

【識別番号】 100094477

【弁理士】

【氏名又は名称】 神野 直美

【電話番号】 06-6220-3405

【選任した代理人】

【識別番号】 100113000

【弁理士】

【氏名又は名称】 中山 亨

【電話番号】 06-6220-3405

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010238

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9903380

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

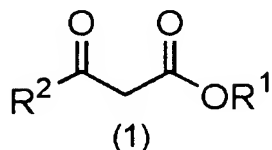
【発明の名称】 光学活性 3-ヒドロキシ酪酸エステル化合物の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一般式 (1)

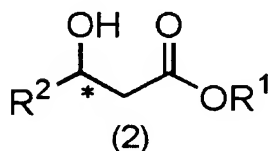
【化 1】



(式中、 R^1 はC 1-C 8アルキル基を表し、 R^2 はハロゲン原子で置換されていてもよいメチル基を表す。)

で示される 3-オキソ酪酸エステル化合物にペニシリウム・シトリナム (*Penicillium citrinum*)、クリプトコッカス・フミコラス (*Cryptococcus humicolus*) およびバシラス・アルベイ (*Bacillus alvei*) からなる群より選ばれる 1 以上の微生物の菌体または菌体処理物を作用させることを特徴とする、一般式 (2)

【化 2】

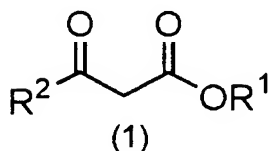


(式中、* は不斉炭素原子を表し、 R^1 および R^2 は前記と同じ意味を表す。)
で示される、光学活性 3-ヒドロキシ酪酸エステル化合物の製造法。

【請求項 2】

一般式 (1)

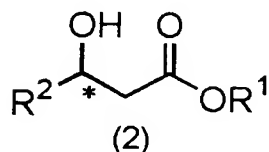
【化 3】



(式中、 R^1 はC 1-C 8アルキル基を表し、 R^2 はハロゲン原子で置換されていてもよいメチル基を表す。)

で示される 3-オキソ酪酸エステル化合物にペニシリウム・シトリナム (*Penicillium citrinum*) IF04631、クリプトコッカス・フミコラス (*Cryptococcus humicola*) IF01527 またはバシラス・アルベイ (*Bacillus alvei*) IF03343t のいずれかの微生物の菌体または菌体処理物を作用させることを特徴とする、一般式 (2)

【化 4】



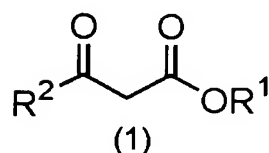
(式中、* は不斉炭素原子を表し、 R^1 および R^2 は前記と同じ意味を表す。)

で示される、光学活性 3-ヒドロキシ酪酸エステル化合物の製造法。

【請求項 3】

一般式 (1)

【化 5】



(式中、 R^1 は C 1 - C 8 アルキル基を表し、 R^2 はハロゲン原子で置換されていてもよいメチル基を表す。)

で示される 3-オキソ酪酸エステル化合物にペニシリウム・シトリナム (*Penicillium citrinum*)、クリプトコッカス・フミコラス (*Cryptococcus humicola*) およびバシラス・アルベイ (*Bacillus alvei*) からなる群より選ばれる 1 以上の微生物の菌体または菌体処理物を作用させることを特徴とする一般式 (1) で示される 3-オキソ酪酸エステル化合物 3 位を光学選択的に還元する方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、4 位がハロゲン原子で置換されていてもよい光学活性 3-ヒドロキシ酪酸エステル化合物の製造法に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】

4 位がハロゲン原子で置換されていてもよい光学活性 3-ヒドロキシ酪酸エステル化合物は医農薬中間体等として有用な化合物であり、その効率的な製造法の開発が望まれている化合物である。

本発明は 4 位がハロゲン原子で置換されていてもよい光学活性 3-ヒドロキシ酪酸エステル化合物の製造法を提供することを課題とする。

【 0 0 0 3 】

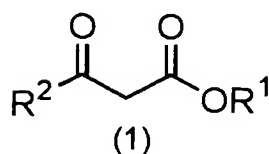
【課題を解決するための手段】

本発明者等は 4 位がハロゲン原子で置換されていてもよい光学活性 3-ヒドロキシ酪酸エステル化合物の製造法を見出すべく鋭意検討した結果、ペニシリウム・シトリナム (*Penicillium citrinum*)、クリプトコッカス・フミコラス (*Cryptococcus humicolus*) およびバシラス・アルペイ (*Bacillus alvei*) からなる群より選ばれる 1 以上の微生物の菌体または菌体処理物が後記一般式 (1) で示される 3-オキソ酪酸エステル化合物を後記一般式 (2) で示される光学活性な 3-ヒドロキシ酪酸エステル化合物に還元する能力を有することを見出し、本発明を完成した。

【 0 0 0 4 】

即ち、本発明は一般式 (1)

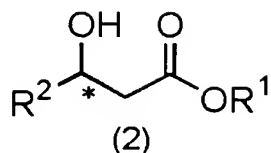
【化 6】



(式中、 R^1 は C 1 - C 8 アルキル基を表し、 R^2 はハロゲン原子で置換されていてもよいメチル基を表す。)

で示される 3-オキソ酪酸エステル化合物にペニシリウム・シトリナム (*Penicillium citrinum*)、クリプトコッカス・フミコラス (*Cryptococcus humicolus*) およびバシラス・アルペイ (*Bacillus alvei*) からなる群より選ばれる 1 以上の微生物の菌体または菌体処理物を作用させることを特徴とする、一般式 (2)

【化 7】



(式中、*は不斉炭素原子を表し、 R^1 および R^2 は前記と同じ意味を表す。)
 で示される、光学活性3-ヒドロキシ酪酸エステル化合物の製造法(以下、本発明製造法と記す。)を提供する。

【0005】

【発明の実施の形態】

一般式(1)及び一般式(2)において

R^1 で示されるC1-C8アルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、 t -ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基が挙げられる。

【0006】

R^2 で示されるハロゲン原子で置換されていてもよいメチル基としては、メチル基及びハロゲン原子で置換されたメチル基が挙げられ、ハロゲン原子で置換されたメチル基としては具体的には例えば、モノフルオロメチル基、モノクロロメチル基、モノブromoメチル基、ジフルオロメチル基、ジクロロメチル基、ジブromoメチル基、トリフルオロメチル基、トリクロロメチル基があげられる。

【0007】

本発明製造法において一般式(1)で示される3-オキシ酪酸エステル化合物を一般式(2)で示される光学活性3-ヒドロキシ酪酸エステル化合物に変換する反応はペニシリウム・シトリナム (*Penicillium citrinum*)、クリプトコッカス・フミコラス (*Cryptococcus humicolus*) およびバシラス・アルベイ (*Bacillus alvei*) からなる群より選ばれる1以上の微生物の菌体または菌体処理物を用いて行われる。

反応に用いられる具体的な微生物の菌体または菌体処理物としては、例えばペニシリウム・シトリナム (*Penicillium citrinum*) IF04631、クリプトコッカス・フミコラス (*Cryptococcus humicolus*) IF01527またはバシラス・アルベイ (B

acillus alvei) IF03343tの菌体または菌体処理物が挙げられる。

【 0 0 0 8 】

ここで、本発明製造法に用いられる微生物の培養について説明する。

本発明製造法に用いられる微生物は炭素源、窒素源、有機塩、無機塩等を適宜含有する各種の微生物を培養するための培地を用いて培養することができる。

【 0 0 0 9 】

培地に含まれる炭素源としては、例えばグルコース、スクロース、グリセロール、でんぷん、有機酸及び廃糖蜜が挙げられ、窒素源としては、例えば酵母エキス、肉エキス、ペプトン、カザミノ酸、麦芽エキス、大豆粉、コーンスティプリカー (corn steep liquor)、綿実粉、乾燥酵母、硫酸及び硝酸ナトリウムが挙げられ、有機塩および無機塩としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、炭酸ナトリウム、リン酸 1 カリウム、リン酸 2 カリウム、炭酸カルシウム、酢酸アンモニウム、硫酸マグネシウム、硫酸銅、硫酸亜鉛、硫酸第 1 鉄及び塩化コバルトが挙げられる。

【 0 0 1 0 】

培養方法としては、例えば、固体培養、液体培養（試験管培養、フラスコ培養、ジャーファーマンター培養等）があげられる。

培養温度及び培養液の pH は微生物が生育する範囲であれば特に限定されるものではないが、例えば、培養温度は 1 5 ～ 4 5 ℃ の範囲、培養液の pH は 4 ～ 8 の範囲を挙げることができる。

培養時間は、培養条件により適宜選択することができるが、通常は 1 ～ 7 日間である。

【 0 0 1 1 】

培養により得られた微生物の菌体はそのまま本発明製造法の反応に用いることができる。微生物の菌体をそのまま用いる方法としては、培養液をそのまま用いる方法、培養液の遠心分離等により菌体を集め、該菌体を緩衝液若しくは水で洗浄した湿菌体を用いる方法等が含まれる。

【 0 0 1 2 】

本発明製造法の反応には、培養により得られた微生物の菌体処理物を用いるこ

ともできる。反応に用いることができる微生物の菌体処理物としては、培養して得られた菌体を有機溶媒（アセトン、エタノール等）処理したもの、凍結乾燥処理したもの、アルカリ処理したもの及び菌体を物理的に又は酵素的に破碎したものを挙げることができる。さらに、菌体処理物には、前記処理を施した後、公知の方法により固定化処理したものも含まれる。

【 0 0 1 3 】

本発明製造法の反応には上記のようにして得られた微生物の菌体又は菌体処理物が用いられる。

【 0 0 1 4 】

該反応は、通常、水の存在下で行われ、この場合の水は緩衝液の形態であってもよく、該緩衝液に用いられる緩衝剤としては、例えば、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム等のリン酸のアルカリ金属塩、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム等の酢酸のアルカリ金属塩等が挙げられる。この場合、反応時の水層の pH は、反応が進行する範囲内で適宜変化させることができるが、通常、pH 3 ～ 10 の範囲内である。

該反応は、さらに疎水性有機溶媒を用いて、水と疎水性有機溶媒の二層系で行うこともできる。この場合に用いられる疎水性有機溶媒としては、例えば、ギ酸エチル、酢酸エチル、酢酸プロピル、酢酸ブチル、プロピオン酸エチル、プロピオン酸ブチル等のエステル類、n-ブチルアルコール、n-アミルアルコール、n-オクチルアルコール等のアルコール類、ベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素類、ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、メチル-tert-ブチルエーテル等のエーテル類、クロロホルム、1, 2-ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類及びこれらの混合物が挙げられる。

【 0 0 1 5 】

反応における原料化合物である一般式 (1) で示される 3-オキソ酪酸エステルの濃度は、通常、50% (w/v) の以下であり、反応系中の一般式 (1) で示される 3-オキソ酪酸エステル化合物の濃度をほぼ一定に保つために、一般式 (1) で示される 3-オキソ酪酸エステル化合物を反応系に連続または逐次加えてもよい。

反応温度の範囲は、通常、0～60℃の範囲である。

反応には、必要に応じて、グルコース、シュクロース、フルクトース等の糖類、エタノール等のアルコール類、界面活性剤等を加えることもできる。

反応時間の範囲は、通常0.5時間～10日間の範囲であり、反応の終点は、一般式(1)で示される3-オキソ酪酸エステル化合物を加え終わった後に、例えば反応液中の原料化合物の量を、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー等により測定することにより確認することができる。

反応終了後は、反応液を有機溶媒抽出、濃縮等の通常の後処理を行うことにより、一般式(2)で示される光学活性3-ヒドロキシ酪酸エステル化合物を単離でき、該化合物は、必要に応じてカラムクロマトグラフィー、蒸留等によりさらに精製することもできる。

【0016】

【実施例】

以下、本発明製造法を実施例により詳細に説明するが、本発明製造法はこれらの例に限定されるものではない。

【0017】

実施例1

500mlの坂口フラスコに滅菌済み培地(1Lの水にポテト抽出物200g及びデキストロース20gを加えたもの)100mlを入れ、ここにペニシリウム・シトリナム(*Penicillium citrinum*) IFO4631の菌体を植菌した。これを30℃で好気条件下、振盪培養した。その後、培養液を遠心分離して菌体を集め、集めた菌体を生理的食塩水5mlに懸濁した。この菌体懸濁液に冷やしたアセトン300mlを加え、濾過した。得られた菌体を真空乾燥し、ペニシリウム・シトリナム(*Penicillium citrinum*) IFO4631のアセトン乾燥菌体を得た。

前記ペニシリウム・シトリナム(*Penicillium citrinum*) IFO4631のアセトン乾燥菌体15mgに、(4-ブロモ-3-オキソ酪酸メチル15mgを溶解した酢酸ブチル1.5ml)及び(グルコース75mg、 NADP^+ 9mg、グルコースデヒドロゲナーゼ15Uを溶解したpH6.5の100mMのリ

ン酸バッファー 1.5 ml) を加え、30℃で18時間振盪した。その後、該反応液を遠心分離し、有機層を分離した。この有機層をガスクロマトグラフィーにより含量分析を行い、4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチル 5.5 mg の生成を確認した。

(含量分析条件)

カラム: HR-20M (0.53 mm×30 m, 1 μm) (信和化工社製)

カラム温度: 120℃ (5分) → 3℃/分 → 150℃ (5分) → 10℃/分 → 200℃ (5分)

キャリアーガス: ヘリウム (流量: 20 ml/分)

検出器: FID

【0018】

次いで、該有機層を減圧濃縮することにより単離した4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルをジクロロメタンに溶解し、無水トリフルオロ酢酸を加え、室温で1時間放置した。この溶液を下記の光学異性体分析条件で分析し、得られた4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルは (S) 体 98% e. e. であると決定した。

(光学活性体分析条件)

カラム: Chirasil-DEX CB (0.32 mm×25 m, 0.25 μm) (CHROMPACK社製)

カラム温度: 80℃ (20分) → 7℃/分 → 150℃

キャリアーガス: ヘリウム (流量: 1.25 ml/分)

検出器: FID

なお、生成物の絶対立体配置は (S) - 4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルの標品と比較することにより決定した。

【0019】

実施例 2

500 ml の坂口フラスコに滅菌済み培地 (1 L の水にポテト抽出物 200 g 及びデキストロース 20 g を加えたもの) 100 ml を入れ、ここにクリプトコッカス・フミコラス (*Cryptococcus humicolus*) IFO 1527 の菌体を植菌

した。これを30℃で好気条件下、振盪培養した。その後、培養液を遠心分離して菌体を集め、集めた菌体を生理的食塩水5mlに懸濁した。この菌体懸濁液に冷やしたアセトン300mlを加え、濾過した。得られた菌体を真空乾燥し、クリプトコッカス・フミコラス (*Cryptococcus humicolus*) IFO1527のアセトン乾燥菌体を得た。

クリプトコッカス・フミコラス (*Cryptococcus humicolus*) IFO1527のアセトン乾燥菌体15mgに、(4-ブロモ-3-オキシ酪酸メチル15mgを溶解した酢酸ブチル1.5ml) 及び(グルコース75mg、 NADP^+ 9mg、グルコースデヒドロゲナーゼ15Uを溶解したpH6.5の100mMのリン酸バッファー1.5ml)を加え、30℃で18時間振盪した。その後、反応液を遠心分離し、有機層を分離した。この有機層をガスクロマトグラフィーにより含量分析を行い、4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチル2.0mgの生成を確認した。

【0020】

次いで、該有機層を減圧濃縮することにより単離した4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルをジクロロメタンに溶解し、無水トリフルオロ酢酸を加え、室温で1時間放置した。この溶液を実施例1の光学活性体分析条件と同じ条件で分析し、得られた4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルは(S)体88%e. e.であると決定した。

【0021】

実施例3

500mlの坂口フラスコに滅菌済み培地(1Lの水にグルコース20g、ポリペプトン5g、酵母エキス3g、肉エキス3g、リン酸2水素カリウム1g、硫酸マグネシウム7水和物0.5g及び硫酸アンモニウム2gを加えたもの)100mlを入れ、予め同じ組成の培地で培養したバシラス・アルベイ (*Bacillus alvei*) IFO3343tの培養液0.3mlを加えた。これを30℃で2日間振盪培養した。その後、培養液を遠心分離して菌体を集め、集めた菌体を生理的食塩水で洗浄した後、生理的食塩水5mlに懸濁した。この菌体懸濁液に冷やしたアセトン300mlを加え、濾過した。得られた菌体を真空乾燥し、バシラ

ス・アルベイ (*Bacillus alvei*) I F O 3 3 4 3 t のアセトン乾燥菌体を得た。

前記バシラス・アルベイ (*Bacillus alvei*) I F O 3 3 4 3 t のアセトン乾燥菌体 1 5 m g に、(4-ブロモ-3-オキシ酪酸メチル 1 5 m g を溶解した酢酸ブチル 1 . 5 m l) 及び(グルコース 7 5 m g N A D⁺ 9 m g、グルコースデヒドロゲナーゼ 1 5 U を溶解した p H 6 . 5 の 1 0 0 m M のリン酸バッファー 1 . 5 m l) を加え、3 0 °C で 1 8 時間振盪した。その後、反応液を遠心分離し、有機層を分離した。

この有機層をガスクロマトグラフィーにより含量分析を行い、4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチル 4 . 5 m g の生成を確認した。

【 0 0 2 2 】

次いで、該有機層を減圧濃縮することにより単離した 4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルをジクロロメタンに溶解し、無水トリフルオロ酢酸を加え、室温で 1 時間放置した。この溶液を実施例 1 の光学活性体分析条件と同じ条件で分析し、得られた 4-ブロモ-3-ヒドロキシ酪酸メチルは (R) 体 9 6 % e . e . であると決定した。

【 0 0 2 3 】

実施例 4

3 0 l 容のジャーファーメンターに滅菌済み培地 (1 L の水にグルコース 2 0 g、ポリペプトン 5 g、酵母エキス 3 g、肉エキス 3 g、リン酸 2 水素カリウム 1 g、硫酸マグネシウム 7 水和物 0 . 5 g、硫酸アンモニウム 2 g を加えたもの) 1 8 l を入れ、予め同じ組成の培地で培養したバシラス・アルベイ (*Bacillus alvei*) I F O 3 3 4 3 t の培養液 1 8 0 m l を加えた。これを 3 0 °C で 2 日間振盪培養した。その後、培養液を遠心分離して菌体を集め、菌体を生理的食塩水で洗浄した後、生理的食塩水に懸濁した。この菌体懸濁液に冷やしたアセトンを加え、濾過した。得られた菌体を真空乾燥し、バシラス・アルベイ (*Bacillus alvei*) I F O 3 3 4 3 t のアセトン乾燥菌体を得た。

前記バシラス・アルベイ (*Bacillus alvei*) I F O 3 3 4 3 t のアセトン乾燥菌体 7 5 0 m g に 4 , 4 , 4 -トリフルオロ-3-オキシ酪酸エチル 1 5 0 m g

及び（グルコース 750 mg、 NAD^+ 9 mg、グルコースデヒドロゲナーゼ 2.25 mg（70 U/mg）に溶解した pH 6.5 の 100 mM リン酸バッファー 30 ml）を加え、30℃で 27 時間攪拌した。その後、反応液に酢酸エチルを加えて遠心分離した。

この有機層をガスクロマトグラフィーにより含量分析を行い、4, 4, 4-トリフルオロ-3-ヒドロキシ酪酸エチル 114 mg の生成を確認した。

（含量分析条件）

カラム：DB-1（0.53 mm×30 m、1.5 μ m）

カラム温度：40℃（5 分）→4℃/分→60℃（0 分）→30℃/分→290℃（2 分）

キャリアーガス：ヘリウム（流量：20 ml/分）

検出器：FID

【0024】

次いで、該有機層を減圧濃縮することにより単離した 4, 4, 4-トリフルオロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルをジクロロメタンに溶解し、無水トリフルオロ酢酸を加え、室温で 1 時間放置した。この溶液を下記の光学異性体分析条件で分析し、得られた 4, 4, 4-トリフルオロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルは（R）体 99% e. e. であると決定した。

（光学活性体分析条件）

カラム：GAMMA-DEX 120（0.25 mm×30 m、0.25 μ m）（SUPELCO 社製）

カラム温度：80℃（5 分）→5℃/分→130℃→20℃/分→200℃（5 分）

キャリアーガス：ヘリウム（流量：1.25 ml/分）

検出器：FID

【0025】

【発明の効果】

本発明により、光学活性 3-ヒドロキシブタン酸エステルを製造することができる。

【書類名】 要約書

【要約】

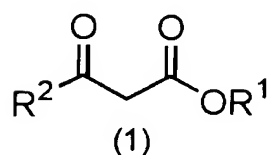
【課題】

4 位がハロゲン原子で置換されていてもよい光学活性 3 - ヒドロキシ酪酸エステル化合物の製造法を提供すること。

【解決手段】

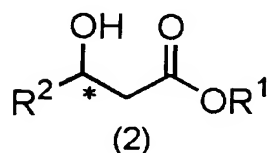
一般式 (1)

【化 1】



で示される 3 - オキソ酪酸エステル化合物にペニシリウム・シトリナム (*Penicillium citrinum*)、クリプトコッカス・フミコラス (*Cryptococcus humicolus*) およびバシラス・アルベイ (*Bacillus alvei*) からなる群より選ばれる 1 以上の微生物の菌体または菌体処理物を作用させることにより、一般式 (2)

【化 2】



で示される、光学活性 3 - ヒドロキシ酪酸エステル化合物を製造する。

【選択図】

なし



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002093]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

氏 名 住友化学工業株式会社